

研究概要

バイオ AFM 先端研究センター

高速AFM研究開発部門

安藤敏夫教授，内橋貴之准教授，渡辺信嗣助教

当部門では、タンパク質などの生体分子や細胞で起こる構造動態や動的プロセスを高解像で動画観察可能な高速AFMの高度化技術開発とその実証応用研究を進めている。従来技術では、精緻ではあっても静止構造しか得られないという限界や、光学プローブを介して間接的にしか動的現象を捉えられないという限界がある。我々が開発した高速AFMはその限界を破る革新的な顕微鏡であるが、その性能・機能の高度化とその新規技術の実証応用研究により、生命科学の発展に更に貢献することを目指している。主な研究テーマは以下の通り。

1. 高速AFMの高度化開発研究

タンパク質分子の機能を損なわずにダイナミクスを高解像で可視化可能な高速AFMは既に完成した。この高速AFMをベースに、細胞などの大きなバイオ試料系のダイナミクスをも観察可能な広域・高速スキャナやその振動を抑制する技術などの開発を行ってきた。また、観察中の試料を探針でマニピュレーションし、その結果を素早く観察できるインターラクティブ高速AFMを開発した。更には、試料ステージ走査に

代わる探針走査型の高速AFMの開発も行ってきた。この探針走査型高速AFMには様々な光学技術が導入可能である。光ピンセットを導入して力作用下にあるタンパク質分子の観察実現を目指している。また、超解像蛍光顕微鏡技術を導入し、高速AFMでは可視化できない蛍光性低分子リガンドを可視化し、そのリガンドのタンパク質との結合・解離とタンパク質の構造動態を同時観察することを目指している。これらの開発により、高速AFMの活用範囲が拡大するとともに、タンパク質の働く仕組みのより詳細且つ深い理解が進むものと期待している。

2. 高速走査型イオン伝導顕微鏡の開発研究

水溶液中で用いるAFMでは探針を試料に接触させるため、真核細胞の膜のように極めて柔らかい試料系ではその接触により試料表面が歪む。それ故、そこに存在する分子を高解像で可視化できない。先鋭化したガラスキャピラリー先端が試料に接近したときに、その先端を流れるイオン流の抵抗が増加することを利用した走査型イオン伝導顕微鏡（SICM）では、非接触で試料表面を可視化できる。しかし、イオン伝導計測に時間がかかるためイメージングは遅い。また、ガラスキャピラリーの先鋭度は十分でなく、解像度は低い。この限界を破る高速・高解像性能を有する高速SICMの開発を進めている。

イメージング研究部門

安藤敏夫教授，紺野宏記准教授，古寺哲幸准教授，中山隆宏助教

当部門では、既に完成している高速AFMや新規に開発された技術を活用して、多様なタンパク質系の機能発現機序の解明を進めている。また、細胞レベルで起こる動的な現象の可視化による新しい細胞生物学研究を開拓しつつある。主な研究テーマは以下の通り。

1. 生体分子の機能解明

分離精製したタンパク質やDNAが溶液中で機能しているときのダイナミックな動作を高速AFM観察し、サブ分子の空間分解能、サブ100msの時間分解能の動画映像から、機能する仕組みを詳細に解明する研究を進めている。既に、アクチン線維上を歩行するミオシンVや光に応答するバクテリオロドプシンなどの撮影に成功し、他の手法では不可能な新しい現象を発見した。ミオシンVの例では、これまでの常識を覆す

エネルギー変換に関する新しい概念の提唱に成功している。このような成功例はあるが、イメージングを最終的に成功させるのは容易ではない。試料調製、試料を載せる基板の検討、アッセイ系の検討、試験観察といった諸工程を粘り強く繰り返す必要がある。この一連の作業を通し、多くのノウハウを蓄積しつつある。様々なタンパク質系が存在するが、機能発現機序の詳細解明に迫るインパクトある成果を得ることを目指し、構造動態が機能に密接に関係するタンパク質系を中心に、イメージング研究を進めている。

2. 細胞レベルで起こる現象の解明

未だ技術の実証レベルに留まるが、エンドサイトーシス、膜のラフリング運動、糸状仮足（ニューロンでは樹状突起）の形成過程といった生きた細胞で起こる動的形態変化の高解像撮影に既に成功している。これらの観察に加え、生きたバクテリアや抽出した細胞内オルガネラの表面という現場で起こる分子プロセスを高速AFMで撮影するという挑戦的な研究も進めている。

超解像AFM研究開発部門

福間剛士教授，浅川 雅助教

当部門では，周波数変調原子間力顕微鏡（FM-AFM）を利用した固液界面計測技術の開発と，その応用研究を行っている。主な研究テーマは以下の通りである。

1. 液中FM-AFMの装置・手法開発

(1) 液中FM-AFMの高速化

液中FM-AFMの主たる構成要素であるカンチレバー，変位計検出器，励振機構，周波数検出器，スキャナ，高圧アンプ，自動制御回路などの高速化に取り組んでいる。また，それらの実用性の改善や，それらを統合した計測システムを開発している。

(2) 3次元水和構造計測技術の開発

従来のFM-AFMの動作原理に改良を加え，固液界面における3次元水和構造の計測を実現した。現在，この技術と上記の高速化技術を統合することによって，比較的凹凸の大きな表面や，不均一性の大きな表面の3次元計測を目指している。

(3) 液中電位計測技術の開発

大気・真空中でのナノスケール表面電位分布計測技術として用いられてきたケルビンプローブ原子間力顕微鏡（KFM）の動作原理に改良を加えて，液中での計測が可能なオープンループ電位顕微鏡（OL-EPM）

を開発した。現在は，この技術を様々な学術・産業分野へと応用するための応用技術開発を進めている。

2. 液中FM-AFMによるナノスケール応用研究

(1) 分子系試料のサブナノスケール液中計測

生体膜の主要な構成要素である脂質分子の二重膜と生理溶液の界面における，水和および表面揺動構造を液中で直接分子分解能観察し，それらの3次元分布を明らかにした。また，タンパク質の非特異吸着抑制能を持つエチレングリコール鎖で終端された自己組織化単分子膜の表面構造を液中で観察し，その分子スケールの構造を明らかにした。

(2) 無機固体試料のサブナノスケール液中計測

CaF₂ (111) / 水界面を原子スケールの分解能で観察し，結晶の溶解，成長，カルシウム水酸化物の析出，プロトンの吸着など，様々な物理化学現象を明らかにした。CaCO₃ (10-14) の純水中における溶解過程を高速AFMにより観察し，ステップ端近傍の原子レベルの動的挙動を直接可視化することに初めて成功した。

(3) 液中電位計測技術の産業分野への応用

様々な分野の民間企業における製品・材料の開発研究に，我々の開発した液中電位計測技術を応用している。また，これらの共同研究を進めることで，本技術を実用化するための技術課題を明らかにし，その対策を進めている。

分子・細胞研究部門

福森義宏教授（平成26年4月1日 理事就任），
田岡 東助教

当部門では，高速AFM観察に適した生物試料系の探索を行っている。その一環として現在，細菌を対象にその探索研究を行っている。

1. 高速AFMを用いた生細胞分子イメージング

これまでの高速AFM観察は，分離精製した分子系を対象としてきた。生細胞表面に存在する分子のイメージングの可能性を探るために，生きた細菌（磁性細菌，光合成細菌，大腸菌など）の表層構造の高速AFM観察を行っている。まず，細胞に損傷を与えず生きたままの状態で基板に固定する方法を開発した。グラム陰性細菌を液体培地中で観察し，外膜の構造とそのダイナミクスをナノサイズの分解能で捉えることに成功した。高速AFMにより明らかになったグラム陰性細菌の外膜は，ポーリンを主な構成分子とした網目状構造により完全に被われていた。外膜はタンパク質分子が規則的に配置された混み合った環境であるこ

とが明らかになり，グラム陰性細菌外膜の新しい構造モデルを提案した。高速AFMによる生細胞分子イメージング法は，多くの細菌に適用可能であり，新しい解析手法となることが期待できる。

2. 磁性細菌のオルガネラの構造解析

磁性細菌は環境中から鉄イオンを取り込み，磁鉄鉱（磁石）を合成し，細胞内のマグネトソームと呼ばれるオルガネラに蓄える。これを磁気コンパスのように用いることによって磁性細菌は地磁気を感知し，地磁気に沿って移動することで，生育に適した環境へと移動する。マグネトソームの構造とその機能を明らかにすることにより，原核細胞の細胞骨格やオルガネラの働きと形成過程，生物鉱物化作用，生物磁気感知の仕組みの解明を目指している。既にマグネトソームの構造や，その表面に存在するタンパク質の観察に成功した。その結果，マグネトソームは，MamAと呼ばれるタンパク質に被われており，これによりマグネトソーム鎖状構造が安定に保たれることが示唆された。現在，マグネトソームに結合するアクチン様細胞骨格の構造などについて研究を進めている。